

09/254152

PCT/JP 97/02989

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

25.09.97

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1996年 8月30日

REC'D	14 NOV 1997
WIPO	PCT

出願番号
Application Number:

平成 8年特許願第230210号

出願人
Applicant(s):

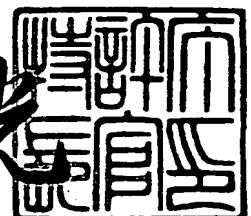
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年10月31日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3088812

【書類名】 特許願
【整理番号】 964160
【提出日】 平成 8年 8月30日
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿
【国際特許分類】 C12P 7/64
【発明の名称】 不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法
【請求項の数】 18
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-602
【氏名】 東山 堅一
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-1006
【氏名】 秋元 健吾
【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京伯楽町 14
【氏名】 清水 昌
【特許出願人】
【識別番号】 000001904
【氏名又は名称】 サントリー株式会社
【代表者】 烏井 信一郎
【代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敏
【電話番号】 03-5470-1900
【選任した代理人】
【識別番号】 100087871
【弁理士】
【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9300154

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物を、大豆から得られる窒素源を有する培地で培養し、その培養物から不飽和脂肪酸含有油脂を採取することを特徴とする、不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法。

【請求項 2】 前記大豆から得られる窒素源が、水分を除く成分あたりの窒素含量が 2 重量% 以上であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆、未脱脂大豆、及びこれらに加工を施したものからなる群より選ばれた少なくとも 1 つ以上であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

【請求項 4】 前記脱脂大豆又は未脱脂大豆に施される加工が、熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；又は該処理を含む化学的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；及び／又は篩分けであることを特徴とする請求項 3 記載の製造方法。

【請求項 5】 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆に少なくとも熱変性を施したものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

【請求項 6】 前記培養物が、菌体培養によって油脂を製造する途中の培養液もしくはその殺菌した培養液、培養終了時の培養液もしくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体もしくはその乾燥物であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 7】 前記微生物の培養を、タンクを使って液体通気培養することを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 8】 前記タンクが、通気攪拌培養槽又はエアリフト培養槽であることを特徴とする請求項 7 記載の製造方法。

【請求項 9】 培養開始から少なくとも 3 日間、グルコースの濃度が 0. 3 重量% 以上、及び／又はグルコースの平均濃度が 0. 5 重量% 以上となるように

維持しながら培養することを特徴とする請求項7又は8記載の製造方法。

【請求項10】 培養日数が、2～20日間であることを特徴とする請求項7～9のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項11】 前記不飽和脂肪酸が、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、及び／又はミード酸であることを特徴とする請求項1～10のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項12】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が35%以下で、かつアラキドン酸含量が20～54%であることを特徴とするアラキドン酸含有油脂。

【請求項13】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比がデスマステロール組成比に対し1.2以下で、かつアラキドン酸含量が20～54%であることを特徴とするアラキドン酸含有油脂。

【請求項14】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が35%以下、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比のデスマステロール組成比に対する比率が1.2以下、かつアラキドン酸含量が20～54%であることを特徴とするアラキドン酸含有油脂。

【請求項15】 モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物から得られる微生物油であることを特徴とする請求項12～14のいずれか1項のいずれかに記載のアラキドン酸含有油脂。

【請求項16】 請求項12～15のいずれか1項に記載のアラキドン酸含有油脂を配合してなる栄養補助食品。

【請求項17】 請求項12～15のいずれか1項に記載のアラキドン酸含有油脂を配合してなる未熟児用調製乳、乳児用調製乳、幼児用食品、又は妊娠婦用食品。

【請求項18】 請求項12～15のいずれか1項に記載のアラキドン酸含有油脂を配合してなる動物用飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物を用いて、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール (24, 25-methylenecolesterol-5-en-3 β -ol) 含有率の少ない不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物は、アラキドン酸、ジホモーアリノレン酸、エイコサペンタエン酸等の不飽和脂肪酸を生産する微生物として知られており、この微生物を用いて発酵法によりアラキドン酸、ジホモーアリノレン酸又はエイコサペンタエン酸を効率よく製造する方法が開発されている（特開昭63-44891、特開昭63-12290、特開昭63-14696、特開平5-91887、特開昭63-14697）。さらにモルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物に変異処理を施して得られる、△12不飽和化活性が低下又は消失している変異株を用いてミード酸を製造する方法も知られている（特開平5-91888）。

【0003】

一方これらジホモーアリノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸等の不飽和脂肪酸は、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質であり、これらを添加した各種の食品及び動物飼料が注目を集めている。

例えばアラキドン酸は、子宮筋収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等の生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれているが、近年、特に乳児の発育に必要な成分として、ドコサヘキサエン酸（以下「DHA」ともいう）とともに急速に研究が進められている。

【0004】

すなわちLanting (LANCET, Vol. 344, 1319-1322 (1994)) らは、生後3週間以上母乳で育てた乳児と、育児用粉乳で育てた乳児を、9歳まで追跡調査し、行動面などから脳神経の小さな障害の発生率を

検討し、育児粉乳で育った子供の脳障害発生率は母乳で育った子供の2倍であると報告した。このショッキングな結果は母乳には存在するが育児用粉乳にはほとんど存在しないDHAやアラキドン酸などの長鎖不飽和脂肪酸が脳の発達に関係したためだと推測されている。このほかにも長鎖不飽和脂肪酸が新生児の脳および網膜の発達に関係しているだろうとする結果が、相ついで報告されている。

【0005】

しかしながらこれらの不飽和脂肪酸含有油脂は安全性が高いと言われながらも微生物起源という問題により、世間に十分浸透しているわけではなく、さらに、LIPIDS、Vol. 27、No. 6、481-483 (1992) には、モルティエラ・アルピナ 1S-4株において、それまで天然に存在することが知られていなかった $24, 25$ -メチレンコレスト-5-エン- 3β -オールが産生されていることが報告されている。従ってより安全に食品や動物飼料に利用することが可能な、モルティエラ属モルティエラ亜属に属する微生物から得られる不飽和脂肪酸含有油脂の開発が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、食品や動物飼料に安心して用いることができ、しかも不飽和脂肪酸を経済的かつ安定的に供給することができる微生物油を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するために、未だ食経験が知られていない $24, 25$ -メチレンコレスト-5-エン- 3β -オール含量が少なく、しかも不飽和脂肪酸含有油脂を効率よく製造する方法を求め、各種培地成分とステロール組成の関係を詳細に検討した結果、モルティエラ属モルティエラ亜属に属する微生物の培養において、大豆から得られる窒素源を使用することにより、 $24, 25$ -メチレンコレスト-5-エン- 3β -オール組成比が小さい油脂が得られることを見い出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物を、大豆から得られる窒素源を有する培地で培養し、その培養物から不飽和脂肪酸含有油脂を採取することからなる、不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明において、不飽和脂肪酸とは炭素数が16以上で、かつ二重結合が1個以上の脂肪酸をいい、またこの中で炭素数が18以上で、かつ二重結合が2個以上の脂肪酸を一般に高度不飽和脂肪酸といい、例えば γ -リノレン酸、ジホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、又はミード酸等を挙げることができる。

【0009】

本発明のモルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物とは、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等を挙げることができ、具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IFO 8571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO 5941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IFO 8568、ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430、CBS 219. 35、CBS 224. 37、CBS 250. 53、CBS 343. 66、CBS 527. 72、CBS 529. 72、CBS 608. 70、CBS 754. 68等の菌株を挙げができる。

【0010】

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醸酵研究所 (IFO)、及び米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壤から

分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM 0219 (微工研菌寄第 8703 号) (微工研条寄第 1239 号) を使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株はそのまま用いることができるが、増殖及び／又は単離を 1 回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質の異なる自然変異株を用いることもできる。

【0011】

また本発明に用いる微生物は、モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物 (野性株) の変異株又は組換え株、即ち、同じ基質を用いて培養したときに、元の野性株が產生する量と比べて、油脂中の不飽和脂肪酸含量が多くなるように、または総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。

【0012】

さらに費用効果の優れた基質を効率よく用いて、対応する野性株と同量の不飽和脂肪酸を產生するように設計された微生物も含まれる。例えば Δ 12 不飽和化活性の欠失した変異株としてモルティエレラ・アルピナ SAM 1861 (微工研条寄第 3590 号、FERM BP-3590) や、 Δ 5 不飽和化活性の欠失した変異株としてモルティエレラ・アルピナ SAM 1860 (微工研条寄第 3589 号、FERM BP-3589) を挙げることができる。

【0013】

上記モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物は、その胞子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターーチ等の一般に使用されているものがいずれも使用できるが、特にグルコース、マルトース、フラクトース、コーンスターーチ、グリセロール、クエン酸が好ましい。

また本発明では、窒素源として大豆から得られる栄養源を用いることにより、油脂中の 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比を少なくすることができる。

【0014】

本発明で使用することができる大豆から得られる窒素源は、水分を除く成分あたりの窒素含量2重量%以上、好ましくは3%以上、さらに好ましくは5%以上であることが望ましい。また大豆から得られる窒素源としては、脱脂大豆又はこれに熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；熱処理、酸処理、アルカリ処理、酸素処理、酵素処理、化学修飾等を含む化学的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；篩分け等の加工を施したもの、あるいは未脱脂大豆に同様の加工を施したものを単独で又は複数組み合わせて使用することができ、一般的なものとしては大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に脱脂大豆に熱変性を施したもの、より好ましくは脱脂大豆に熱変性を施しさらにエタノール可溶性成分を除去したものが好ましい。

【0015】

またこれ以外に必要に応じて、ステロール組成に大きく影響しない範囲で、他の窒素源、例えばペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティーブリカ、尿素等の有機窒素源、並びに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源の1種又は複数種を配合することができる。

また必要に応じて微量栄養源として、リン酸カリウム、リン酸二水素カリウム等のリン酸塩、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等の無機塩類及びビタミン等も使用できる。

【0016】

また本発明においては、培地中に目的とする不飽和脂肪酸の基質を添加して培養することにより、該不飽和脂肪酸の蓄積を促進することもできる。不飽和脂肪酸の基質として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩若しくはカリウム塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリ

ン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて使用できる。基質の総添加量は培地に対して0.001～10重量%、好ましくは0.5～10重量%である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0017】

上記の炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン及び／又は添加物は培養開始前の培地及び／又は培養中の培養液に添加することができる。これらの培地成分は一度に添加することもでき、又は連続的に、若しくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。これらの培地成分は各々単独で、又は予め混合して添加することができる。これら培地成分は菌の生育を阻害しない濃度であれば特に制限しない。実用上、一般に炭素源は0.1～30重量%、好ましくは1～15重量%、窒素源は0.01～10重量%、好ましくは0.1～5重量%の濃度とするのが望ましい。

【0018】

また培養温度は5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理により、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の生成量を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～8として通気攪拌培養、振とう培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～20日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

【0019】

特に通気攪拌培養槽又はエアリフト培養槽のようなタンクを使って液体通気培養することにより不飽和脂肪酸含有油脂を商品化が可能な収率で產生することができる。またこの際、培養開始から少なくとも3日間、グルコース濃度が0.3重量%以上及び／又はグルコース平均濃度が0.5重量%以上、好ましくはグルコース濃度が0.5重量%以上及び／又はグルコース平均濃度が0.7重量%以上、さらに好ましくはグルコース濃度が0.5～5重量%及び／又はグルコース平均濃度が0.7～3重量%となるように維持しながら培養することによりさら

に不飽和脂肪酸含有油脂を効率よく製造することができる。例えばアラキドン酸を乾燥菌体1gあたり100mg以上、好ましくは120mg以上製造することができる。

【0020】

このようにして、菌体内には、目的とする不飽和脂肪酸を豊富に含有し、しかも24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが少ない油脂が大量に生成蓄積される。

目的とする油脂は、菌体培養によって油脂を製造する途中の培養液もしくはその殺菌した培養液、または培養終了時の培養液もしくはその殺菌した培養液、またはそれから集菌した培養菌体もしくはその乾燥物から、常法に従って得ることができる。

培養菌体からは、例えば次の方法により目的とする油脂を採取することができる。

【0021】

培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。

【0022】

抽出物から減圧下で有機溶剤を留去することにより、高濃度の不飽和脂肪酸含有油脂を得ることができる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

【0023】

上記のようにして得られた油脂中には、不飽和脂肪酸がトリグリセリドやフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトールに結合した状態で存在しているが、ほとんどがトリグリセリドの形で存在する。培養物から採取した不飽和脂肪酸含有油脂から不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを分離精製するには、常法により、ヘキサン抽出後、脱酸、脱色、脱臭、脱ガム処理、あるいは冷却分離などにより行うことができる。

本発明において、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比とは、ステロール組成分析法によって次のようにして求められる。

【0024】

まず、ステロール組成分析法を説明する。原料油脂30~80mgを、栓付き試験管内に秤量し、メタノール4mL及び33%水酸化カリウム水溶液1mLを添加し栓をする。これを80°Cで緩く攪拌しながら1時間反応させた後、放冷し、脂溶成分をヘキサンで抽出する。得られたヘキサン溶液をフェノールフタレイン指示薬が水層に着色しなくなるまで水洗し、減圧濃縮により分析サンプルを得る。分析サンプルを少量のヘキサンに溶解し、下記の表に記す条件のガスクロマトグラフィーに供する。市販のデスマステロール標準品とガスクロマトグラムを比較することにより、デスマステロールのピーク同定を行う。

【0025】

その保持時間がデスマステロールの0.8~2.0倍の間に検出される成分がステロール成分であり、その保持時間内の全てのステロール成分についてのガスクロマトグラムのピーク面積を常法により求める。該成分全ピーク面積の総和に対する各成分のピーク面積の割合を各成分の組成比とする。例えば、全ステロール面積の総和に対するデスマステロール検出ピーク面積の割合をデスマステロール組成比とする。24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールはデスマステロールの保持時間の1.07~1.12倍の保持時間に検出される。全ピーク面積の総和に対する24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール検出ピーク面積の割合を24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比とする。

【0026】

使用カラム ULBON HR-1 (内径0.25mm、長さ25m)

カラム温度 280°C

注入口及び検出器温度 300°C

キャリアガス及びゲージ圧力 ヘリウム 1.2 kg/cm²

マイクアップガス及び流量 窒素 70 mL/min

検出器 FID

スプリット比: 20

【0027】

本発明の不飽和脂肪酸含有油脂は、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が35%以下、好ましくは33%以下、より好ましくは30%以下である。及び/又はこの24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールは、同じく油脂中に存在するデスマステロールに対し、1.2以下、好ましくは0.9以下、より好ましくは0.6以下である。デスマステロールとは、モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物を培養して得られる油脂中に、24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールとともに含まれている成分で、母乳中に存在することが知られている。

【0028】

さらに本発明の不飽和脂肪酸含有油脂の一例として、油脂中の全脂肪酸に対しアラキドン酸が20~54重量%、好ましくは30~50重量%であって、しかも24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が35%以下、好ましくは33%以下、より好ましくは30%以下、及び/又は24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが、同じく油脂中に存在するデスマステロールに対し、1.2以下、好ましくは0.9以下、より好ましくは0.6以下であるアラキドン酸含有油脂が挙げられる。

【0029】

また該アラキドン酸含有油脂は、トリグリセリド含量が90%以上、水分が0.1%以下、酸価が0.5以下、過酸化物価が5以下であり、色は、ロビボンド法133.4mmセルにおいて黄が50以下、赤が10以下であり、脂肪酸組成は、アラキドン酸が20~54%、好ましくは30~50%、ミリスチン酸が0.

2~0.7%、パルミチン酸が10~16%、ステアリン酸が4~10%、オレイン酸が5~15%、リノール酸が5~15%、 γ -リノレン酸が1~5%、 α -リノレン酸が0.1~2%、ジホモ- γ -リノレン酸が1~6%、エイコサペンタエン酸が0~1%、リグノセレン酸が2~7%の油脂特性を有する。

【0030】

該油脂は、アラキドン酸をトリグリセリドの形で豊富に含有し、エイコサペンタエン酸を含有しないか、含有しても極微量であるため、食品、特に未熟児用調製乳、乳児用調製乳、幼児用食品、又は妊娠婦用食品の原料として好ましい。また本発明の不飽和脂肪酸含有油脂は、未だ食経験が知られていない24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール含有率が少ないため、食品や動物飼料に安心して用いることができる。

【0031】

【実施例】

次に、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

実施例1

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IFO 8570を用い、グルコース2%、食用大豆タンパク（商品名：エスサンミート、味の素社製）1%、なたね油0.1%を含む培地1400Lを2000L通気搅拌培養槽に入れ、温度28°C、通気量1.0vvm、搅拌80rpm、槽内圧1.0kg/cm² Gの条件で通気搅拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を1.5%に維持し、7日間の培養後、濾過により菌体を回収し油脂抽出を行った。また、比較例として、食用大豆タンパクの代わりに酵母エキス1%を使用して、同様の培養及び油脂抽出を行った。

【0032】

得られた油脂のステロール組成を、前記の手順に従って分析したところ、保持時間9.6分付近にデスマステロールが、10.5分付近に24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが検出された。比較例では、保持時間6.5分付近にデスマステロールが、7.2分付近に24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが検出された。結果を表1に示す。24, 25-メチ

レンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が少ないアラキドン酸含有油脂が得られた。

【0033】

【表1】

表 1

	24, 25-メチレンコ -レスト-5- エン-3 - β - オール組成 比 (A)	デスモステロ ール組成比	A/B	総ステロ ール量*	アラキド ン酸含量**
実施例	30 %	65 %	0.46	1 %	8 %
比較例	65 %	27 %	2.41	1 %	9 %

* 油脂中のステロール含量

** 油脂中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含有率

【0034】

実施例2

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) CBS 754. 68を用い、グルコース4%、きな粉1.3%、酵母エキス0.2%、オリブ油0.1%を含む培地600Lを1000L通気搅拌培養槽に入れ、温度24℃、通気量1.0vvm、搅拌100rpm、槽内圧0.5kg/cm²の条件で5日間の通気搅拌培養を行ない、濾過、乾燥により菌体を回収しヘキサン抽出により油脂を得た。また、比較例として、グルコース4%、酵母エキス1.5%、オリブ油0.1%の培地で同様の培養を行い油脂を得た。なお実施例、比較例共に培養2日目にグルコース1%を流加した。

【0035】

得られた油脂のステロール組成を、前記の手順に従って分析したところ、保持

時間 10. 2 分付近にデスマステロールが、 11. 2 分付近に 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが検出された。比較例では、保持時間 6. 4 分付近にデスマステロールが、 7. 1 分付近に 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールが検出された。結果を表 2 に示す。24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が少ないアラキドン酸含有油脂が得られた。

【0036】

【表 2】

表 2

	24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比	デスマステロール組成比 (B)	A/B	総ステロール量*	アラキドン酸含量**
実施例	25 %	53 %	0.47	1.2 %	4.8 %
比較例	68 %	16 %	4.25	1.1 %	4.6 %

*油脂中のステロール含量

**油脂中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含有率

【0037】

実施例 3

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) ATCC 32221、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) ATCC 42430を用い各々培養を行なった。グルコース 4 %、脱脂大豆粉 1. 2 %、リン酸水素カリウム 0. 2 %、大豆油 0. 1 %を含む培地 25 L を 50 L 通気搅拌培養槽に入れ、温度 28 ℃、通気量 1. 0 vvm、搅拌 300 rpm、槽内圧 1. 0 kg/cm² G の条件で 5 日間の通気搅拌培養を行ない、濾過、乾燥によ

リアラキドン酸含有菌体を回収し、得られた菌体からヘキサン抽出により油脂を得た。

【0038】

また、比較例として、グルコース4%、ビール酵母粉末1.2%、リン酸水素カリウム0.2%、なたね油 0.1%を含む培地で同様の培養を行い油脂を得た。なお実施例、比較例共に培養2日目にグルコース1%を追加した。なお、実施例、比較例共に、培養2日目にグルコース1%を添加した。得られた油脂のステロール組成を、前記の手順に従って分析した。表3にその結果を示す。24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オール組成比が少ないアラキドン酸含有油脂が得られた。

【0039】

【表3】

表 3

24,25-メチレン コレスト-5-エ ン-3- β -オ ル組成比 (A)	デスマステロ ール組成比 (B)	A/B	総ステロ ール量*	アラキド ン酸含量**
<hr/>				
モルティエレラ				
アルピナ	5 %	67 %	0. 07	0. 9 % 25 %
ATCC32221				
比較例	37 %	28 %	1. 32	0. 8 % 20 %
モルティエレラ				
アルピナ	5 %	35 %	0. 14	0. 9 % 18 %
ATCC42430				
比較例	40 %	25 %	1. 60	1. 0 % 18 %

*油脂中のステロール含量

**油脂中の全脂肪酸に対するアラキドン酸の含有率

【0040】

実施例4

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ CBS 754. 68 を用い、グルコース 2 %、大豆タンパク 1. 5 %、大豆油 0. 1 % を含む培地 1400 L を 2000 L 通気培養槽に入れ、温度 24 ℃、通気量 1 vvm、攪拌 80 rpm、槽内圧 200 kPa の条件で通気攪拌培養を開始した。流加法によりグルコース濃度を 0. 5 ~ 1. 5 % に維持し、7 日間培養を行った後、濾過により菌体を回収した。菌体を乾燥した後、ヘキサン抽出を行い、抽出油を脱酸、脱色、脱臭し、抗酸化剤としてトコフェロールを 0. 05 % 添加した。得られた油脂を分析し

たところ、以下の組成であった。

【0041】

分析結果

トリグリセリド含量 95.6%

水分 0.04%

酸価 0.08

過酸化物価 2.16

色（ロビボンド法 133.4mmセル）黄：20.1、赤：1.4

脂肪酸組成

アラキドン酸 44.4%

ミリスチン酸 0.6%

パルミチン酸 14.6%

ステアリン酸 8.8%

オレイン酸 6.3%

リノール酸 10.2%

γ-リノレン酸 3.2%

α-リノレン酸 0.8%

ジホモ-γ-リノレン酸 5.2%

エイコサペンタエン酸 0.2%

リグノセレン酸 4.8%

総ステロール含量 1.0%

24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3β-オール組成比 24%

デスマステロール組成比 67%

【0042】

実施例5

実施例4で得られたアラキドン酸含有油脂と魚油及び植物油を適宜混合し、必須脂肪酸調整油脂を得た。該必須脂肪酸調整油脂の他、育児用調製粉乳100kgを調製するに当たり、以下に示す原材料及び成分を用意した。そしてこれらの原材料を常法に従って溶解、混合、清浄化した後、殺菌、濃縮、均質化し、噴霧乾

燥して育児用調製粉乳を得た。

【0043】

原材料及び成分

カゼイン	5. 6 kg
ホエイ蛋白質濃縮物	24. 0 kg
必須脂肪酸調整油脂	25. 0 kg
(リノール酸、 α -リノレン酸を主に含む)	
アラキドン酸として	80 g
ドコサヘキサエン酸として	25 g
エイコサペンタエン酸として	10 g
糖質（乳糖及びオリゴ糖）	43. 4 kg
ミネラル類及びビタミン類	2 kg
合計	100 kg

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールの含有率の
小さい不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法の提供。

【解決手段】 モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierell
a) 亜属に属する微生物を、大豆から得られる窒素源を有する培地で培養し、そ
の培養物から不飽和脂肪酸含有油脂を採取することを特徴とする不飽和脂肪酸含
有油脂の製造方法。

【効果】 24, 25-メチレンコレスト-5-エン-3 β -オールの含有率の
少ない油脂が得られる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100077517

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 石田 敏

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 西山 雅也

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由]

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社